ELEKTROPHORETISCHE UNTERSUCHUNGEN AN CASEIN

Inauguraldissertation

der philosophischen Fakultät II der Universität Bern
zur Erlangung der Doktorwürde

vorgelegt von

Heinz Zürcher
von Frutigen (Kt. Bern)

Von der philosophischen Fakultät II auf Antrag des
Herrn Prof. Dr. R. Signer angenommen

Bern, den 8. Juli 1948

Der Dekan:
sig. Prof. Dr. J. CADISCH

Gekürzte, von der Fakultät genehmigte Fassung
Mikrofilmkopien der ungekürzten Dissertation sind bei der Stadt- und
Hochschulbibliothek Bern erhältlich

Buchdruckerei Muri . Muri b. Bern . 1950

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

INHALTSVERZEICHNIS

Einleitung Seite

A. Einteilung der Arbeit 2
B. Allgemeines über die Elektrophorese 3

1. Kapitel

Einfluss der Konzentration auf das elektrophoretische Verhalten von Casein

a) Bekanntes über das Verhalten von Casein bei der Elektrophorese 9
b) Problemstellung 12
c) Herstellung der Lösungen 13
d) Die Diagramme und ihre Auswertung 15
e) Diskussion 22

2. Kapitel

Elektrophoretische Untersuchungen an Casein-Formaldehyd-Lösungen

a) Problemstellung 26
b) Die Lösungen und ihre Diagramme 28
c) Zusammenfassung und Diskussion 34

3. Kapitel

Versuche über den Einfluss von Denaturierungsmitteln auf das Casein

a) Problemstellung
  1. Das Labferment und seine Wirkung auf das Casein . . . 38
  2. Bekanntes über die Denaturierung 40
b) Methodisches 45
c) Erste Versuche 50
d) Versuche mit erhitztem Casein 52
e) KCNS 55
f) Natrium-Salicylat 56
g) Harnstoff 59
h) Guanidin-Hydrochlorid 61
i) Thioharnstoff 66
k) Elektrophorese 71
l) Diskussion 80

Zusammenfassung

Literaturverzeichnis

Zusammenfassung

EINLEITUNG

Es wird kurz über die Einteilung der Arbeit berichtet. Ein grösserer Abschnitt behandelt das Prinzip der Elektrophorese, den Aufbau der Apparatur, die verwendeten Pufferlösungen, die Auswertung der Elektrophoresediagramme und die Gründe, die für das Abweichen der Diagramme vom Idealfall verantwortlich sind.

I. KAPITEL

Einfluss der Konzentration auf das elektrophoretische Verhalten von Casein

Es wird eine knappe Darstellung des Verhaltens von Casein bei der Elektrophorese gegeben, wobei das Gewicht besonders auf die Arbeiten von Mellander und Warner gelegt wird.

Die eigenen Versuche sollten Auskunft über die Abhängigkeit der Wanderungsgeschwindgkeit sowie des Prozentgehaltes an freiem β-Casein von der Konzentration geben.

Es werden die Herstellung der Lösungen, sowie die Elektrophoresediagramme und ihre Auswertung beschrieben. Es wurde gefunden, dass die Wanderungsgeschwindigkeit sowohl für α- wie für β-Casein eine leichte lineare Abnahme mit steigender Konzentration zeigt. Der aus den Diagrammen berechnete Prozentgehalt an freiem β-Casein nimmt mit steigender Konzentration (0,5 — 4 %) beträchtlich ab (von 25 auf 10 %). Aufgetragen gegen die Konzentration, ergibt er eine Kurve, die einer Dissoziationskurve sehr ähnlich sieht; diese Kurve entspricht einer Dissoziationskonstante von 2 bis $4 . 10^{-1}$. Dass die beobachtete Verschiebung im Mengenverhältnis der beiden Komponenten nicht nur scheinbar und durch überlagerte Puffergradienten vorgetäuscht ist, konnte durch Versuche bei erhöhter Jonenstärke gezeigt werden.

Die schon von früheren Autoren angenommene Komplexbildung zwischen α- und β-Casein wird durch unsere Untersuchungen bestätigt. Die beiden Fraktionen bilden ein reversibel dissoziables Komponentensystem, das dem Massenwirkungsgesetz folgt.

Die extrem asymmetrische Form, die der absteigende α-Gradient bei höheren Konzentrationen (über 2 %) annimmt, wird auf die beträchtliche Viskosität der höher konzentrierten Lösungen sowie auf die Poly-

dispersität des α-Caseins zurückgeführt. Diese Annahme wird durch vergleichende Versuche mit Serum, dessen Albuminkomponente monodispers ist, gestützt.

2. KAPITEL

Elektrophoretische Untersuchungen an Formaldehyd-Casein

Die bisherigen Erkenntnisse über die Formaldehyd-Casein-Reaktion werden in aller Kürze zusammengestellt, wobei besonders auf die sogenannte Brückentheorie eingegangen wird.

Im experimentellen Teil wurden neutrale Caseinlösungen verschiedener Konzentration mit Formaldehyd im Ueberschuss behandelt und alsdann nach dreitägiger Dialyse gegen Puffer ihre Elektrophoresediagramme aufgenommen. Es zeigte sich, dass mit zunehmender Konzentration des Caseins während der Reaktion der Gradient des β-Caseins mehr und mehr verschwindet (bei sonst gleichbleibenden Bedingungen wie Elektrolytkonzentration, Reaktionszeit und -temperatur). Von 4 % Casein an aufwärts bleibt nach der Einwirkung des Formaldehyds nur noch ein Gradient sichtbar.

Die Wanderungsgeschwindigkeit der Umsetzungsprodukte mit Formaldehyd ist gegenüber nativem Casein beträchtlich erhöht, da die Basizität infolge Blockierung der NH_2-Gruppen durch den Formaldehyd erniedrigt wird und somit bei gleichem pH eine höhere Ladung resultiert. Die Deutung für das Zusammenschmelzen von α- und β-Gradient zu einem einzigen Gradienten ist in einer hauptvalenzmässigen Verknüpfung der α- und β-Caseinteilchen zu grösseren Komplexen zu suchen.

Die Versuche stellen eine Stütze für die Brückentheorie dar und eröffnen zudem bei Verwendung von Modellsubstanzen eine neue Methode zum Studium der Frage, welche Gruppen bei der Molekülverknüpfung beteiligt sind.

3. KAPITEL

Versuche über den Einfluss von Denaturierungsmitteln auf das Casein

Im theoretischen Teil wird auf die Wirkung des Labfermentes auf das Casein eingegangen, wobei besonders die Schutzkolloidtheorie von Linderström-Lang und Holter berücksichtigt wird. Durch die Labwirkung wird diese eine Komponente gespalten, verliert ihre Schutzwirkung und die schwerlöslichen Bestandteile fallen aus. Weiter werden bekannte Tatsachen über die Proteindenaturierung behandelt.

Die Fragestellung für die eigenen Versuche war: Besteht die Labwirkung in einer blossen Denaturierung der Schutzkolloidkomponente, wie von Nitschmann und Lehmann vermutet wurde?

Blosses Erhitzen einer Natrium-Caseinatlösung macht dasselbe resistenter gegen die Fällung mit $Ca^{\cdot\cdot}$-Jonen.

Casein wurde ferner mit denaturierenden Agentien versetzt und dann wieder durch Fällung oder Dialyse von ihnen befreit. Dann wurde das Casein bei pH 6,9 gelöst und seine Fällungskurve mit Calciumchlorid aufgenommen (Brigando, Gerber). Dieser Test lässt natives Säurecasein und Labcasein eindeutig unterscheiden.

Verschiedene Denaturierungsmittel wie Kaliumrhodanid, Natrium-Salicylat, Harnstoff, Guanidin-Hydrochlorid und Thioharnstoff wurden in Form von 50 %igen Lösungen verwendet und das Casein darin zu einer 6 %igen Lösung gelöst.

Nach 24-stündigem Stehen wurde das Denaturierungsmittel entfernt, entweder durch Verdünnen der Lösung, Herabsetzen des pH auf den isoelektrischen Punkt und Auswaschen der Fällung, oder durch Dialyse der ursprünglichen Lösung gegen Wasser. Die mit der Ausfällungsmethode erhaltenen Präparate zeigen bei allen Denaturierungsmitteln (ausgenommen Kalium-Rhodanid und Guanidin-Hydrochloryd) eine stark erhöhte Calcium-Empfindlichkeit.

Das durch Dialyse von den Denaturierungsmitteln befreite Casein zeigte eine normale, in einzelnen Fällen sogar eine schwach verminderte Calcium-Empfindlichkeit.

Besonders die Versuche mit Thioharnstoff, der seiner geringen Löslichkeit wegen nicht in Wasser, sondern in einer 50 %igen Harnstofflösung gelöst wurde, sind interessant. Es konnte hier nach Fällung der Hauptmenge des Caseins durch Wasserzusatz und pH-Senkung aus der Mutterlauge mit Hilfe von Ammonsulfat eine geringe, besonders leichtlösliche Komponente isoliert werden, bei deren Fehlen sich das Casein durch starke Ca-Empfindlichkeit auszeichnete. Wird diese Komponente dem gefällten Thioharnstoffcasein nachträglich wieder zugesetzt, so zeigt die Mischung eine ähnliche Ca-Empfindlichkeit wie das native Casein.

Die Elektrophoresediagramme, besonders diejenigen des Thioharnstoffcaseins, zeigen das Auftauchen verschiedener neuer Gradienten.

Die Ergebnisse dieser Versuche werden diskutiert und die verschiedenen Isolierungsmethoden und ihre Auswirkungen miteinander verglichen. Es wird angenommen, dass es sich bei der leichtlöslichen Fraktion um die Schutzkolloidkomponente im Sinne von Linderström-Lang handeln könte, die hier, im Gegensatz zur Labung, durch fraktionierte Fällung entfernt wird. Da die Wirkung der Denaturierungsmittel, wenn das Casein durch Dialyse von ihnen befreit wird, eher in Richtung einer Stabilisierung gegen Calcium geht, erfährt die Ausgangsfragestellung mindestens vorerst eine negative Antwort.

LEBENSLAUF

Am 21. Juli 1920 wurde ich, Heinz Zürcher, von Frutigen, in Bern geboren. Meine Schulzeit an den städtischen Schulen schloss ich im Herbst 1940 mit der Maturitätsprüfung an der Realabteilung des Gymnasiums ab. Anschliessend begann ich mit dem Studium der Chemie an der Universität Bern.

Die vorliegende Arbeit wurde 1946/47 im Institut für organische Chemie der Universität Bern unter der Leitung von Herrn Privatdozent Dr. Hans Nitschmann durchgeführt.